

Pengaruh Interaksi Fisika Amoksisilina Trihidrat-Kalium Klavulanat terhadap Peningkatan Potensi Antibiotika pada Bakteri Non-Beta Laktamase *Sarcina Lutea* Sp.

Ilma Nugrahani, Sukmadjaja Asyarie, Sundani Nurono S., Slamet Ibrahim
Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung

Abstract

*The relation between physical interaction amoxicillin-clavulanate with their increasing antibiotic sensitivity to non-betalactam bacteria: *Sarcina lutea* sp has been studied. Amoxicillin and clavulanate were mixing as physical mixture (AC-PM) and freeze dried binary system (AC-FD). The experiment measuring the inhibition diameter to *Sarcina lutea* sp from physical mixture (AK-CF) and freeze dried mixture (AK-BK) in molar ratios: 0:10; 1:9; 2:8; until to 10:0. The results showed that there were increasing antibiotic potency with extremity on (3:7); (5:5); (7:3) physical mixtures and on (3:7); (5:5); (6:4) freeze dried binary systems. The result is relevant with preliminary research that proved the extreme interactions on the molar ratios.*

Keywords: *amoxicillin, clavulanate, physical interaction, freeze drying, antibiotic potency, non beta lactamase, *Sarcina lutea* sp.*

Pendahuluan

Selama ini diketahui bahwa amoksisilina trihidrat dan kalium klavulanat bekerja sinergis sebagai antibiotika dengan spektrum kerja luas. Klavulanat dikombinasikan dengan amoksisilina dengan tujuan meningkatkan potensi antibiotika dengan mekanisme penghambatan enzim beta-laktamase.^{1,2,3} Namun demikian, terdapat fakta yang menunjukkan bahwa klavulanat juga meningkatkan potensi antibiotika amoksisilina terhadap bakteri non-betalaktamase dengan mekanisme yang belum dapat dijelaskan hingga saat ini.⁴ Di sisi lain telah ditemukan permasalahan tingginya variabilitas kualitas fisik dan profil farmakokinetika pada sediaan amoksisilina-klavulanat yang beredar di pasaran.^{5,6} Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian tentang interaksi amoksisilina trihidrat

dengan kalium klavulanat untuk menjelaskan mekanisme dan pengaruhnya terhadap potensi antibiotika. Penelitian-penelitian sebelumnya telah menyimpulkan bahwa terdapat interaksi fisika kimia antara amoksisilina trihidrat dengan kalium klavulanat yang memungkinkan menyebabkan tingginya variabilitas kualitas fisik dan farmakokinetika sediaan kombinasi antibiotika tersebut.^{7,8,9,10}

Pada penelitian pertama telah dilaporkan bahwa interaksi amoksisilina-klavulanat dapat diamati secara visual dengan jelas di bawah mikroskop polarisasi dan terukur dengan kalorimeter larutan dalam larutan NaOH. Disimpulkan juga bahwa interaksi terjadi secara ekstrem pada perbandingan 3:7; 5:5; dan 7:3.⁷ Penelitian tahap berikutnya menyimpulkan bahwa interaksi pada

perbandingan yang sama juga teramati secara visual dan terukur secara jelas dengan kalorimeter larutan dalam pelarut HCl 0,1N dan dapar fosfat 6,8 sebagai model larutan saluran cerna.^{7,8} Penelitian berikutnya menyimpulkan bahwa pada keadaan padat, kristal air amoksisilina trihidrat berikatan dengan kalium klavulanat yang diperkirakan diikuti dengan hidrolisis dan oksidasi klavulanat.⁹ Penelitian terakhir menunjukkan sistem dua komponen amoksisilina trihidrat-kalium klavulanat yang dipreparasi dengan metode rekristalisasi *freezedrying*/beku kering (BK) dalam dapar fosfat pH 6,8 menunjukkan titik-titik interaksi penting pada perbandingan 3:7; 5:5; dan 6:4.¹⁰ Keseluruhan hasil penelitian tersebut mengantarkan kepada kesimpulan secara umum bahwa terjadi interaksi fisika antara amoksisilina trihidrat - kalium klavulanat baik dalam keadaan padat maupun terlarut pada perbandingan molar amoksisilina-klavulanat = 3:7 hingga 7:3 dengan titik belok 5:5.

Interaksi tersebut diperkirakan berkaitan pada peningkatan efek kerja antibiotika terhadap bakteri non-betalaktamase yang telah diketahui sebelumnya namun belum pernah dirumuskan mekanismenya.⁴ Penelitian berikut ini bertujuan membuktikan adanya hubungan antara interaksi fisika amoksisilina-klavulanat dengan aktivitas antibiotika bakteri non-betalaktamase. Metode yang digunakan adalah pengukuran diameter hambatan amoksisilina-klavulanat campuran fisik dan sistem dua komponen hasil *freezedried* pada berbagai perbandingan molar terhadap pertumbuhan bakteri *Sarcina lutea* sp. *in-vitro*. Penyiapan sampel disamakan dengan metode pembuatan kristal beku kering sistem

dua komponen amoksisilina-klavulanat yang telah dilaporkan pada percobaan sebelumnya.¹⁰ Sebagai perbandingan dilakukan uji aktivitas antibiotika campuran fisika amoksisilina trihidrat - kalium klavulanat terhadap bakteri yang sama.

Bahan dan Cara

Bahan

Bahan yang digunakan adalah : amoksisilina trihidrat (ex. Sandoz *batch* no. 243 Z dari PT Tempo Scan Pacific), kalium klavulanat (ex. Fermic, Mexico, *batch* no. CKA - 2967 dari PT Tempo San Pacific), air suling, dapar fosfat pH 6,8, nutrien agar, bakteri *Sarcina lutea* sp., agar miring.

Alat

Alat yang digunakan adalah : Timbangan Mettler M3 (ITB, Bandung), alat *freeze dryer* (ITB, Bandung), cawan pertumbuhan bakteri, cakram kertas, alat-alat gelas untuk pembuatan larutan dan pengenceran, mikropipet, peralatan sterilisasi dan perangkat untuk kerja aseptik, lemari inkubasi (ITB, Bandung).

Cara kerja

Penyiapan Campuran Fisik

Amoksisilina trihidrat-Kalium klavulanat (AK-CF)

Bahan baku amoksisilina trihidrat dan kalium klavulanat ditimbang dan dicampur homogen dengan *zaalfcart* dalam perbandingan bobot = 0:10; 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2; 9:1; dan 10:0.

Pembuatan Kristal beku kering AK-BK

Amoksisilina trihidrat-kalium klavulanat dengan perbandingan 0:10; 1:9; 2:8; 3:7; 4:6; 5:5; 6:4; 7:3; 8:2; 9:1; dan 10:0 dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,8, selanjutnya dibekukering dengan *freezedrying* selama 20 jam.

Penyiapan Larutan Sampel

Amoksisilina trihidrat - kalium klavulanat campuran fisik (AK-CF) berbagai perbandingan dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,8 sedangkan kristal beku kering (AK-BK) seluruh komposisi masing-masing dilarutkan dengan air suling steril; kesemuanya pada konsentrasi 200 mcg/mL.

Penyiapan bakteri

Sarcina lutea sp. ditumbuhkan pada agar miring dan selanjutnya dibuat suspensi dengan tansmitans ± 16 .

Penyiapan media

Sebanyak 4 mL suspensi bakteri dicampur dengan 21 mL nutrien agar cair dan dibiarkan mengeras.

Uji Hambat Pertumbuhan Bakteri dan Analisis

Pada pelat agar ditempatkan cakram kertas dan ditetaskan larutan berbagai perbandingan AK-CF dan AK-BK dalam konsentrasi 200 mcg. Pelat pertumbuhan bakteri dengan cakram kertas yang telah ditetesi antibiotika 0,1 mL dibiarkan selama 1 jam dan selanjutnya dimasukkan dalam lemari inkubasi selama 18-24 jam. Dibaca diameter hambatnya. Untuk setiap larutan sistem dua komponen AK-CF dan AK-BK dilakukan uji-ulang sebanyak 6x, dirata-rata dan dihitung

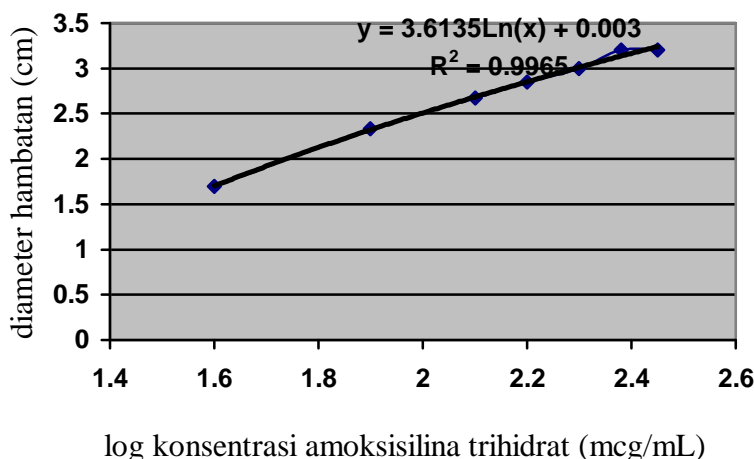
simpangan deviasi dan derajat kepercayaannya.

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian-penelitian sebelumnya diperoleh data bahwa sistem larutan yang paling stabil untuk amoksisilina trihidrat - kalium klavulanat adalah dapar fosfat pH 6,8.^{7,8} Dalam penelitian ini amoksisilina trihidrat dan kalium klavulanat serta campuran fisiknya dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,8. *Sarcina lutea* sp. dipilih sebagai bakteri uji karena merupakan bakteri penghasil beta laktamase sehingga diharapkan dapat menunjukkan fenomena peningkatan potensi amoksisilina trihidrat oleh kalium klavulanat yang dinyatakan disaranai oleh kompetisi terhadap enzim beta laktamase. Secara struktur klavulanat lebih mudah berikatan dengan enzim beta-laktamase dibandingkan amoksisilina namun di sisi lain, klavulanat tidak memiliki aktivitas antibiotika.^{1,2,3} Sebagai orientasi dilakukan uji potensi antibiotika dengan hasil percobaan dicantumkan pada tabel 1, yang menunjukkan bahwa diameter hambatan bakteri *Sarcina lutea* sp. dari klavulanat dalam dapar fosfat pH 6,8 sampai konsentrasi 1000 mcg/mL = 0. Sementara itu hambat minimum amoksisilina trihidrat dalam dapar fosfat pH 6,8 adalah 6 mcg/mL.

Tabel 1. Konsentrasi hambat minimum amoksisilina dan kalium klavulanat

Larutan Bakteri	Amoksisilina trihidrat bahan baku			Kalium klavulanat Bahan baku			
	L (4mcg/ml)	M (6mcg/ml)	H (8mcg/ml)	L	M	H	1000mcg/ mL
<i>Sarcina lutea</i> sp.	-	+	++	-	-	-	



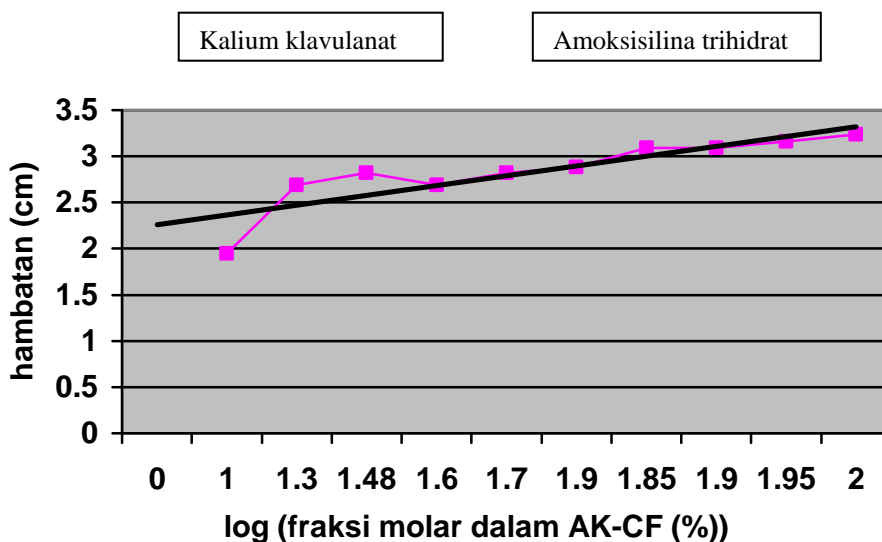
Gambar 1 Kurva diameter hambatan bakteri (*Sarcina lutea* sp.) versus konsentrasi amoksisilina trihidrat.

Selanjutnya, untuk mendapatkan hasil pengamatan yang lebih jelas diamati diameter hambat dari larutan amoksisilina dan sistem dua komponen amoksisilina klavulanat berbagai komposisi dengan konsentrasi 40, 60, 80, 120, 160, dan 200 mg/mL yang menghasilkan kurva hambatan vs konsentrasi dari amoksisilina trihidrat seperti digambarkan pada gambar 1. Pada gambar tersebut diperlihatkan bahwa diameter hambatan pertumbuhan bakteri merupakan fungsi dari logaritma konsentrasi amoksisilina trihidrat (dilakukan 6x, dengan SD = 0,035; $r = 0,9965$).

Gambar 1 menunjukkan kurva garis lurus antara log fraksi amoksisilina dengan hambatan pertumbuhan bakteri yang sesuai dengan persamaan garis lurus: $y = \log x + c$. Sebagai perbandingan, dilakukan uji diameter hambatan dari campuran fisik amoksisilina trihidrat-kalium klavulanat (AK-CF) dengan konsentrasi yang terpilih 200 mcg/mL dengan hasil

ditunjukkan pada kurva pada gambar 2. Diperoleh suatu kurva yang tidak sepenuhnya linear, khususnya pada titik (3:7). Diperkirakan pada titik tersebut dimulai terjadinya interaksi fisik yang cukup kuat antara amoksisilina-klavulanat yang cukup kuat dibandingkan dengan titik-titik yang lain.

Tahap penelitian selanjutnya adalah memeriksa potensi antibiotika pada preparat sistem interaksi amoksisilina-klavulanat yang diperoleh dengan teknik beku kering (AK-BK).¹⁰ Teknik beku kering memungkinkan bagi amoksisilina dan klavulanat untuk berkontak secara molekular saat dilarutkan bersama, yang kemudian dilanjutkan dengan proses pembekuan dan penarikan pelarut dengan tekanan tinggi dan meninggalkan suatu kristal sistem interaksi padatan. Evaluasi aktivitas antibiotika dilakukan pada konsentrasi yang sama, yaitu 200 mcg/mL.

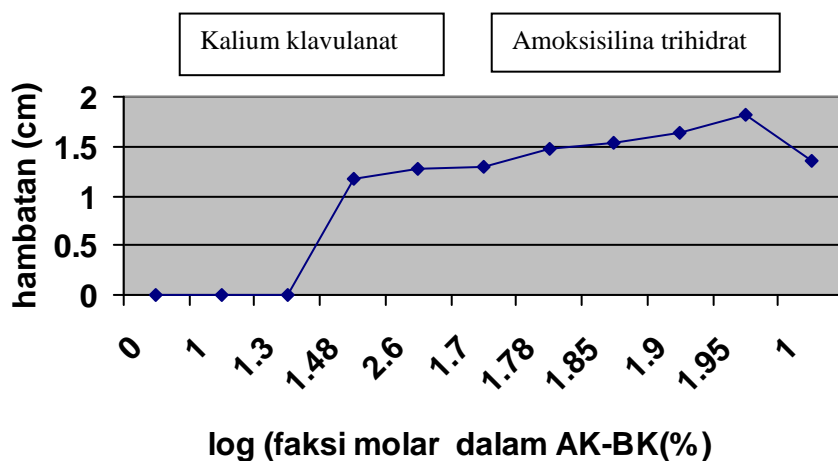


Gambar 2 Kurva hambatan campuran fisik amoksisilina-klavulanat (AK-CF)

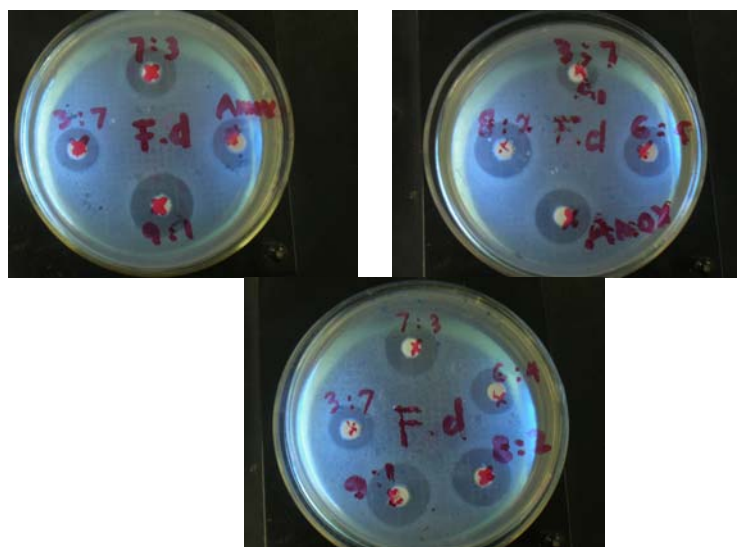
Hasilnya ditunjukkan pada gambar 3. Pada kurva yang merupakan plot antara log konsentrasi (dalam hal ini fraksi molar amoksisilina terhadap sistem interaksi) dengan hambatan, ditunjukkan bahwa pada perbandingan 1 : 9 dan 2 : 8 belum tampak hambatan pertumbuhan bakteri, sedangkan pada 3 : 7, relevan dengan kurva hambatan AK-CF, tampak peningkatan tajam potensi antibiotika sistem dua komponen. Tidak munculnya hambatan pada perbandingan 1 : 9 dan 2 : 8 diperkirakan disebabkan oleh terjadinya hidrolisis selama proses beku kering yang menyebabkan kadar amoksisilina trihidrat berkurang dibandingkan dengan sebelum dibekukeringkan atau karena terbentuk suatu modifikasi akibat proses beku kering membentuk kristal anhidrat seperti yang terjadi pada kasus ampisilin.¹¹ Pada beberapa kasus,

proses beku kering dapat menyebabkan berbagai konsekuensi perubahan dimensi struktur kristal.^{11,12,13}

Namun demikian, berbeda dengan sistem AK-CF pada berbagai perbandingan yang secara keseluruhan memiliki potensi yang lebih rendah dari amoksisilina tunggal, sistem dua komponen AK-BK sejak perbandingan 6:4 menunjukkan potensi antibiotika yang lebih tinggi dari amoksisilina tunggal BK. Diperkirakan pada titik 5 : 5 interaksi fisika kimia antara amoksisilina-klavulanat BK mencapai titik ekuivalen membentuk sistem dua komponen dengan sifat yang mirip dengan amoksisilina tunggal BK.^{9,10} Kemiripan sifat tersebut kemungkinan disebabkan terkurungnya klavulanat di dalam molekul-molekul amoksisilina trihidrat pada titik ekuivalen.



Gambar 3 Kurva diameter hambatan terhadap fraksi bobot Amoksisilina trihidrat di dalam AK-BK



Gambar 4 Hambatan pertumbuhan bakteri *Sarcina lutea* sp pada cawan nutrien agar oleh AK-BK

Sebagai gambaran visual ditunjukkan hambatan pertumbuhan *Sarcina lutea* sp. oleh AK-BK berbagai komposisi pada gambar 4. Pada foto hasil percobaan tersebut dapat diamati

bahwa sejak perbandingan molar 6:5 ditunjukkan hambatan pertumbuhan bakteri yang sama atau lebih tinggi dibandingkan dengan amoksisilina tunggal beku kering pada bobot yang

sama. Sesuai dengan dugaan sebelumnya, hasil penelitian secara keseluruhan menunjukkan bahwa interaksi fisika amoksisilina trihidrat - kalium klavulanat berhubungan dengan peningkatan potensi antibiotika melawan bakteri non-beta-laktamase. Dibandingkan dengan campuran fisik tanpa perlakuan beku kering, sistem AK-BK lebih dapat menggambarkan adanya hubungan antara interaksi fisika-kimia amoksisilina trihidrat - kalium klavulanat terhadap peningkatan potensi antibiotika terhadap *Sarcina lutea sp.* Namun demikian, belum dapat dirumuskan suatu hubungan matematis antara interaksi dengan derajat peningkatan aktivitas mengingat kurva yang ditunjukkan tidak linear dan memiliki beberapa titik belok. Pada tahap penelitian selanjutnya perlu dilakukan uji aktivitas sistem interaksi dengan menyamakan bobot amoksisilina trihidrat dalam campuran dan memvariasikan bobot klavulanat untuk mendapatkan fraksi yang sama. Lebih jauh lagi juga akan dipelajari mekanisme peningkatan potensi antibiotika tersebut dengan mengidentifikasi bentuk ikatan antara sistem interaksi amoksisilina-klavulanat dengan sisi reseptor mikroorganisme non-betalaktamase melalui suatu eksperimen kristalografi.

Simpulan dan Saran

Telah dibuktikan bahwa interaksi fisika kimia amoksisilina trihidrat-kalium klavulanat berpengaruh terhadap peningkatan potensi antibiotika amoksisilina trihidrat-kalium klavulanat terhadap bakteri non-betalaktamase *Sarcina lutea sp.* Sistem interaksi amoksisilina-klavulanat hasil preparasi beku kering (AK-BK) memiliki potensi antibiotika yang lebih tinggi

dibandingkan dengan preparat amoksisilina trihidrat tunggal beku kering dengan titik ekstrem pada perbandingan molar 3:7; 5:5; dan 6:4. Penelitian selanjutnya diharapkan dapat mengukur secara kuantitatif dan merumuskan mekanisme yang terjadi secara lebih rinci dari fenomena peningkatan potensi antibiotika amoksisilina-klavulanat terhadap bakteri non-betalaktamase. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi masukan yang bermanfaat bagi pihak farmasis dan tenaga medis.

Daftar Pustaka

1. American Hospital Formulary Service. Drug Information. Wisconsin: American Society of Hospital Pharmacist Inc. 2002.
2. Reynolds, J.E.F. (Ed.). Martindale: The Extra Pharmacopoeia. 33th-ed. The Pharmaceutical Press, London, 2003; 187.
3. Storm, K.H, Conley, C.P., and Roush, J.A. Amoxicillin and potassium clavulanate dosage form, United States Patent: 6.756.057, 2003, accessed on 25th February 2006.
4. Smith, G.M., Slocombe, B., Abbott, K.H., and Mizen, L.W. Activity of Amoxicillin-Clavulanate against Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in an Experimental respiratory Infection Model in Rats, Antimicrobial Agent & Chemotherapy **42** (4) 1998; 813-817.
5. Chadha, R., Kashid, N., Jain, R.V.S. Microcalorimetric evaluation of the invitro compability of amoxicillin/ clavulanic acid and ampicillin/ sulbactam with ciprofloxacin, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **36** 2004; 195-307.
6. Vree, T.B., Dammers, E., and Exler, P.S., Identical pattern of highly variable absorption of clavulanic acid from four different oral formulations of co-amoxiclav in healthy subjects, Journal of Antimicrobial Chemotherapy **51**, 2003; 373-378.

7. Florence, A.T. & Salole, E.G., ed. Formulation Factors in Adverse Reactions. Wright, London, 1994; 40-52.
8. Vahdat, L. Factors influencing the rate of degradation of Amoxicillin sodium and potassium clavulanate in the liquid and frozen states. Perth: Curtin University of Technology, Library and Information Service, 2000. PhD Thesis.
9. Nugrahani, I., Asyarie, S., Soewandhi S.N., Ibrahim, S., Cold Contact Method for Physical Chemical Interaction Detection of Amoxicillin Trihydrate - Potassium Clavulanate. Yogya: ICCS-Seminar, UGM, Juni-2007.
10. Nugrahani, I., Asyarie, S., Soewandhi S.N., Ibrahim, S., Solid State Interaction Study of Amoxicillin Trihydrate - Potassium Clavulanate Solid State by DSC, XRD, and FTIR, Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences, in press, 2007.
11. Brittain, H., ed. Polymorphism in Pharmaceuticals Solids. Marcel Dekker Inc., New York, 1999; 396.
12. Cartensen, J.T. Advanced Pharmaceutical Solids. Marcel Dekker, New York, 2001; 176-178.
13. Byrn, S. R., Pfeiffer, R.R., and Stowell, J.G. Solid State Chemistry of Drugs. 2nded. SSCL Inc., West Labosette, Indiana, 2000; 280-303.

